

Helsinki 27.04.99

23/09  
PCT / F 1991 00192  
5

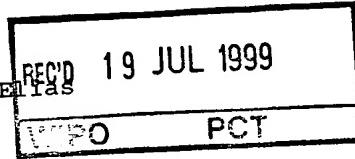
09/646043

E T U O I K E U S T O D I S T U S  
P R I O R I T Y D O C U M E N T



Hakija  
Applicant

HAKALEHTO, ETTAS  
Kuopio



Patentihakemus nro  
Patent application no

980571

Tekemispäivä  
Filing date

13.03.98

Kansainvälinen luokka  
International class

C 12Q

Keksinnön nimitys  
Title of invention

"Mikrobiien osoitusmenetelmä"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja  
jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan  
annetuista selityksestä ja patenttivaatimuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies  
of the description and claims originally filed with the  
Finnish Patent Office.

Pirjo Kaila  
Tutkimussihteeri

PRIORITY DOCUMENT

Maksu 220,- mk  
Fee 220,- FIM

Osoite: Arkadiankatu 6 A  
Address: P.O.Box 1160  
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Puhelin: 09 6939 500  
Telephone: + 358 9 6939 500

Telefax: 09 6939 5204  
Telefax: + 358 9 6939 5204

2

21

### Keksinnön tausta

Osoitettaessa mikrobeja esimerkiksi kliinisistä näytteistä, elintarvike- tai ympäristönäytteistä, mikrobioiden pitosuudet alkuperäisessä näytteessä ovat yleensä niin alhaiset, että tarvitaan nk. rikastusmenetelmiä, joiden avulla osoitettavien mikrobioiden määritä ja pitosuutta näytteessä lisätään. Tähän käytetään eri mikrobeille soveltuivia spesifisia viljelymenetelmiä, joihin sisältyy tavallisesti nk. selektiivisen tekijän käyttö muiden mikrobioiden lisääntymisen estämiseksi.

Mikrobioiden osoittamisessa rikastusmenetelmiin turvautuminen merkitsee ajanhukkaa ja siksi niiden toteuttamiseen tarvittavan ajan lyhentäminen on suotavaa.

Spesifisessä mikrobioiden tunnistamisessa käytetään usein claimissa tai soluviljelmissä tuotettuja vasta-aineita (immunologiset menetelmät). Niitä käytetään usein mikrobioiden osoitukseen rikastusviljelmissä. Ongelmana voi tällöin olla se, että testin suorittajalla ei ole tarkkaa tietoa siitä, sisältävätkö tutkittava viljelma ja siinä olevat solut riittävästi osoitettavia antigenisia molekyylejä.

### Keksinnön kuvaus

Kasvatettaessa *Salmonella*-suvun bakteerilajeja ja muita enterisia bakteereita selektiivisilla ravintoalustoilla havaittiin, että ne muodostivat runsasta spesifisia antigenisia molekyylejä jo ennen kuin varsinaisen solujen lukumäärään perustuva mikrobiopopulaation kasvu oli maksimissaan. Itse asiassa spesifisten vasta-aineiden havaitsemien antigenien pitosuus solujen pionoilla oli oleellisesti vähentynyt huippulukemistaan solukasvun lähestyessä maksimiaan rikastusviljelmässä. Tämän vuoksi immunologisen osoitusmenetelmän käyttäminen voi tapahtua nykyisin tunnettuja menetelmiä aikaisemmin heti ns. stationäärisen vaiheen päättymisen jälkeen ennen kuin solujen lukumäärä on olennaisesti lisääntynyt esimerkiksi pesäkelaskuun perustuvien laskentamenetelmiä avulla määritettäessä. Selektiivisenä tekijänä rikastusviljelyssä voidaan käyttää esimerkiksi lämpötilaa, ravintoalustan koostumusta, antibiootteja tai muita selektiivisia molekyylejä sekä eri kaasujen osapaineiden säätelyä.

12

**VAATIMUKSET**

1. Mikrobiologinen määritysmenetelmä, jonka avulla mikrobit osoitetaan kasvualustaltaan selvästi ennen populaation solukasvun huippua solujen heti stationäärvivaiheen jälkeen syntetisoimien antigenien avulla.
2. Vaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa mikrobiantigenit osoitetaan immunologisesti vasta-aineiden avulla.
3. Vaatimusten 1 ja/tai 2 mukainen menetelmä, jossa osoitettavat antigenit ovat proteiineja.
4. Jonkin vaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, jossa osoitettavat mikrobit ovat bakteereja.
5. Jonkin vaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, jossa osoitettavat mikrobit ovat enteerisiä bakteereja.
6. Jonkin vaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, jossa osoitettavat mikrobit ovat fekaalisia koliformeja.
7. Jonkin vaatimuksista 1-3 mukainen menetelmä, jossa osoitettavat mikrobit kuuluvat sukuun Salmonella.
8. Yhden tai useamman vaatimuksista 1-7 mukainen menetelmä, jossa mikrobeja inkuboidaan ennen immunologista osoitusta niiden optimilämpötilassa.
9. Jonkin vaatimuksista 1-7 mukainen menetelmä, jossa mikrobeja inkuboidaan ennen osoitusta yli 40 °C:n lämpötilassa.

